日本水產學會誌

第十七卷 第四號

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 17, No. 4, 1951

目 次

CONTENTS

昭和二十六年

日本水產學會

The Japanese Society of Scientific Fisheries

TOKYO

水産物の腐敗に關する研究
3. 尿素及び Urease 活力の定量

清水　亘・大石圭一
（京都大学農学部水産学教室）

Studies on the putrefaction of the aquatic products.
3. Analysis of urea and urease-activity

Wataru Simidu • Keiiti Oisi

In the present work, we found that 30% ethanol was most suitable for extracting of soya-bean urease, and was successful with 20 times in volume of powderd soya-bean. The optimum pH of this enzyme preparation was 7.2～7.8, and the optimum temperature was 30～35°. It took 10 to 30 minutes to digest completely 10 cc. of 0.1% urea solution, when the enzymic activity was powerful enough, but if it was poorer, it took 90 to 120 minutes. And the enzymic activity was proportional to the mass of the preparation. On these basis, we improvled the analytical methods of urea and urease-activity in fish muscles.

板鰓類魚肉の腐敗を研究する上に尿素の定量が必要であるが，その１法として urease 法がある。然るに本法は研究者により操作がまちまちであり，その根據とする反應條件に疑点が見出されたので，更めて再檢討を試み，その結果を魚肉中の尿素の定量法に應用し，逆に urease 活度の測定にも利用した。

Urease の抽出　大豆粉末に 20 倍量の 30％アルコールを加えて 15 分間振盪，15 分間遠心分離して上澄液をとり，4～8° の冷藏庫に貯藏して，その活力を試験した。基質として再結晶せる尿素の 0.1％ 溶液を用いた。その 10 cc 中の窒素量は 4.68mg の計算値になるが，Kjeldahl 法による実測の結果は 4.45mg であつた。この基質 10 cc に酵素液 5 cc, M/15 燐酸塩緩衝液 (pH 7.0) 1 cc を加え，40°, 30分間反應せしめた後生成せるアンモニア窒素を測定した。結果は Table 1 の通りである。これによればこの條件下では（温度が高過ぎることがあとでわかつたが）尿素の約 90％が分解され，酵素液は冷藏庫内で約１週間は貯藏出來ることが知られる。

同樣の方法により種々の溶劑で Urease を抽出し，その活力を比較した。その結果は Table 2 の通

Table 1

Storing time of urease preparation(days)	Urease-activity NH_3—N (mg)		
1	3.98	3.76 *	
3	4.02	3.98	3.85*
4	3.85	3.76	
6	3.76	4.10	
7	4.23		
8	3.55		

* Toluol was added.

Table 2
Comparison of urease-activity in various preparations

Kind of Solvent	cc. of preparation				
	5		0.5		0.3
30% ethanol	4.20	4.40	4.02		
30% methanol	4.10	3.93	2.14	2.05	
M/10 NaCl	4.27		2.99	2.52	
Distilled water	4.27		2.86	2.96	
Benzol			0.34	0.39	0.38
Acetone			0.30		0.09
Glycerine			1.81		1.24
C Cl_4	0.60		0.25	0.21	

昭和25年10月３日受理

りである。この場合は基質 10 cc に酵素液 5 cc, 0.5 cc, 0.3 cc を加え，35° で 30 分間反應させた。この結果によれば，Urease 活力の順位は 30 % アルコール>再溜水・ M/10 食塩水> 30 % メタノール>グリセリンで，ベンゾール・アセトン・4塩化炭素等は抽出劑として不適當である。よつて以後の實驗は 30 % アルコールを用いることにした。

反應溫度 從來の研究では反應適溫は明瞭に示されていない。0.1 % 尿素溶液 10 cc に燐酸塩緩衝液 5 cc，酵素液 5 ccを加え，30分間反應せしめた結果は Fig. 1 の如くであつた。これによれば30～35° が適溫のように見える。

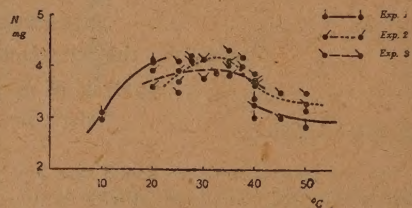


Fig. 1 Optimum temperature of urease activity.

最適水素イオン濃度 Ureaseの最適 pH に関しては多数の研究結果が発表せられておる。MORI[1] は 7.15，HOWELL・SUMNER[2] は 6.5 (くえん酸塩及び醋酸塩緩衝液)，6.9～7.6 (燐酸塩緩衝液)，BACH[3] は *Asp. niger* の Urease の場合 7,5 としした。TAKEUCHI[4] によれば最適 pH は有機物の存在により変化するという。私等は基質 10 cc，酵素液 5cc に M/15 燐酸塩緩衝液 20 cc 及び 1 ccを加えて，夫々 35° 及び 40° で30分間反應せしめて Table 3 の結果を得た。

Table 3
The Optimum pH of urease of soya-bean.

pH of buffer solution	20 cc. of buffer soln. added				1 cc. of buffer soln. added	
	Initial pH	Final pH	NH_3-N observed		Initial pH	NH_3-N observed
5.3	5.3	5.4	0.43	0.15	7.0	4.30
5.9	5.9	6.6	0.38	0.17	7.2	4.35
7.0	7.1	7.8	3.42	3.42	7,8	4.39
8.0	80	8.8	2.73	2.39	8.4	4.22

この結果によれば最適 pH は 7.2～7.8 あたりにあるように見える。しかし反應が進むに從つてアンモニアの発生により反應液の pH は著しく変化し，緩衝液を20cc加えた場合ですらその変化は非常に大きい。殊に基質として魚肉を用いた場合には魚肉自身の緩衝作用のため緩衝液添加の効果は微弱である。また Table 3 にも見るように，緩衝液を多量に加えるとその阻害作用が現わるようであり，魚肉の場合には緩衝液の添加は不要と考えられる。故に以後の試験には緩衝液を用いなかつた。

反應時間 0.1 % 尿素液 10 cc に酵素液の量を種々に変えて加えで，35° て 10分，30分，60分，90分間反應せしめ，生成するアンモニア窒素を測定した。結果は Fig. 2 に示す。これによれば酵素量十分な時は 10 分間以內に極限値に達し，以後は微量ながら減少の傾向が見られる。酵素量が不十分な場合には 90 分後に於ても所期の値に達しない。故に最適條件下に於ては 10～30 分間の反應で十分である。

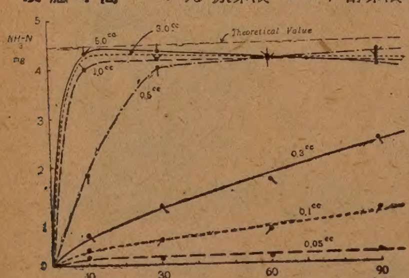


Fig. 2 Urease activity, refered to mass of urease preparation and reacting time.

しかし Urease 活力を測定するには 90 分或はそれ以上を要する。實驗結果から反應時間 90 分の場合の尿素分解速度は Fig. 3 に示す如く大體に於て

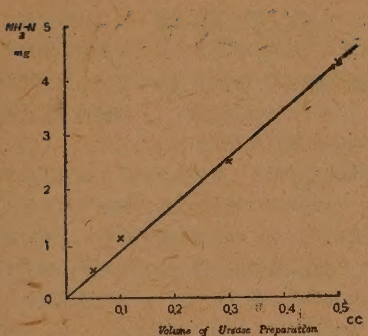


Fig. 3 Re'ation between urease activity and quantiy of urease preparation.

Urease の濃度に比例することがわかる。故に反應を逆に利用して Ure se 活度を測定することが出來る。

Urease 活力の阻害　普通に使用される防腐劑が Urease の作用を阻害しないかを試驗するため實驗を行つた。結果は Table 4 の如くである。これによれば防腐劑が過多の場合には微かに阻害を受けるように見えるが，少量ならば殆ど無害である。

Table 4
Preventing action of various anticeptics on urease

Aetiseptics		Urease activity NH_3—N mg
(1) 0.1% urea 10cc., Urease preparation 5 cc., buffer (pH 7.0) 0.5cc., 35°, 30min.		
Control		
Chloroform	0.1cc.	4.36
〃	1.0cc.	4,19
Thymol	0.1 g	3.98
〃	1.0 g	4.32
Toluol	0,1cc.,	
chloroform	0.1cc.,	4.28
thymol	0.1 g	4.32
(2) 0.1 % urea 10cc, urease preparation 5 cc., buffer (pH 7.0) 1 cc., 40°, 30 min.		
Control		3.98
Toluol		3.76

次に金屬塩の阻害作用を見るため NaCl, $FeCl_2$ 及び $CuSO_4$ を選び，0.1 % 尿素液 10 cc, 酵素液 5 cc, 緩衝液 (pH 7.0) 0.5 cc の混合液に所期濃度の 10 倍の濃度を有する金屬塩溶液 1.72 cc を加え，全反應液が所期濃度になるようにし，35° で 30 分間反應させた。その結果は Fig. 4 の如くである。この結果によれば NaCl は 10^0〜10^{-1} M, $FeCl_2$ は 10^{-3} M, $CuSO_4$ は10^{-5} M で阻害作用が失われる。

次に加熱による酵素力の減少を試驗した。酵素液を所定溫度に所定時間保持し，一旦冷却してからその 5 cc を 0.1 % 尿素液 10 cc に加え，35° で 30 分間反應せしめてアンモニア窒素を測定した。その結果は Fig. 5 の如くである。これによれば 50° では 1 時間の加熱によつて大きい變化がないが，それ

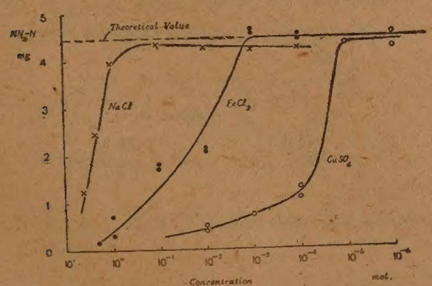


Fig. 4. Retarding action of various metalic salts on urease activity.

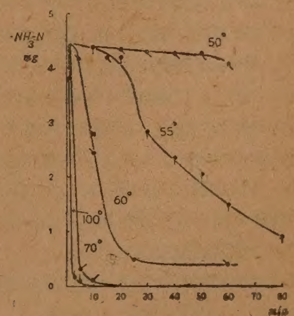


Fig.5 Destruction by heat of urease activity.

以上では變化が起り，60° 以上では短時間内に急激に破壞される。今 Fig. 5 から，所定溫度に30分間保つた時の Urease の活力を求めて圖示すると Fig. 6 の如くになる。

尿素の定量法　以上の豫備實驗から勘案して大豆 Urease による尿素の定量法を次の如く定めた。即ち約 0.1 % 濃度の尿素含有溶液 10cc に，大豆粉末を 20 倍量の 30 % アルコールで抽出した酵素液

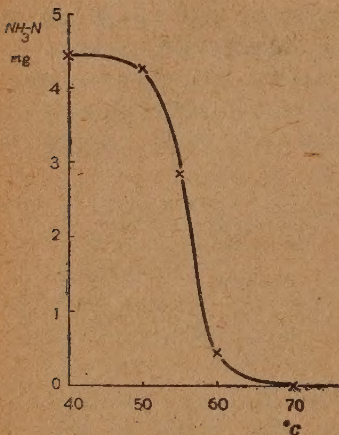


Fig. 6 Urease activity as the preparations kept in various temperatures for 30 minutes.

5 cc を加え，密栓して 35°，30分間反應せしめ，生成するアンモニア窒素を定量して尿素窒素とする。之を魚肉に應用するには約0.01 g の尿素含有肉（サメ肉ならば約 1 g）を精秤し，10 cc の水に溶かして試料を調製する。勿論この際対照試験を行い，尿素以外の窒素を差引かねばならぬ。

魚肉の尿素を定量するに当り，從來水浸出法が採用されて來たが，試驗によれば魚肉中の尿素を完全に抽出することは容易でない。例えば 721 mg% の尿素窒素を含むサメ肉100g を 100 cc 宛の水で連續2回抽出，遠心分離したが，殘渣中に尚 152 mg% の尿素窒素が殘つた。故に魚肉の懸濁液をそのまま使用することが簡單でもあり，正確である。カレイ肉 100 g に尿素（44.5% 窒素含有）2 g を加えて試驗した結果回收値 911 mg 及び 885 mg を得た（計算値は 890 mg）。この値に 2.1077 を乘ずれば尿素量になる。

尚，尿素定量の際，尿素が分解されて生成するアンモニアが揮発して起る誤差の程度を知るために次の実驗を試みた。即ち約 0.05 乃至 1.0% NH_3—N を含む種々の濃度のアンモニア液 10 cc を三角瓶に容れ，1組は密栓して 37° に2時間，他の組は開放して 24 時間 5～8° の室温に放置し，アンモニアの揮発量を測定した。その結果は Fig. 7 の如くで，密栓すればアンモニアの損失は殆ど起らない。

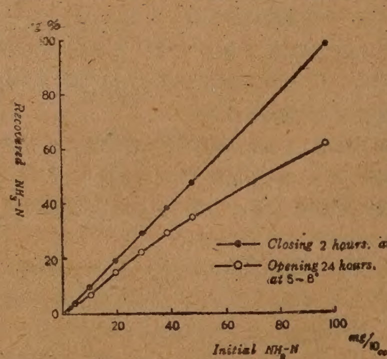


Fig. 7 Volatile loss of ammonia, in both closing and opening states.

Urease 活度の測定　Urease 活度の單位として Sumner (5) は 20°，5分間で 1.5% 尿素液（pH 7.0）に作用して 1 mg のアンモニアを生ずる場合を1單位と定めたが，前に述べたように，微弱な Urease 活度を測定するには不適当と考えられる。故に，反應時間 90～120 分間の場合，酵素量と分解生產物量とが比例する事実を利用し，私等は次のようにした：即ち酵素の最適條件下（30～35°，pH 7.2～7.8）に於て 0.1% 尿素液10 cc に種々の量の酵素液を加え，90～120 分間に尿素を完全に分解し得る酵素液の最小量を求め，その逆数を以て酵素活度を表わす。

（本報は文部省科学研究費による業績の一部である。）

文　　献

（1）Mori, S.: J. Biochem., **8**, 1, 1927.
（2）Howell, St. F. • J. B. Sumner: J. Biol. Chem., **104**, 619, 1934.
（3）Bach, D.: Soc. Biol., **100**, 831, 1929.
（4）Takeuchi, T.: J. Biochem., **17**, 47, 1933.
（5）Sumner, J. B.: Erg. Enzymf. I, 295, Leipzig, 1932.

水産動物肉に關する研究
第9報　熱凝固曲線の變化

清水　亘・宅間　均
（京都大学農学部水産学教室）

Studies on the muscle of the aquatic animals. 9. The change of the heat coagulation curve of the fish muscle plasma.

Wataru SIMIDU • Hitosi TAKUMA

In the present work, we found that the heat coagulating curves of the plasms of fish muscle were divided into two types; one was smooth in curvature up to 65°, and the other was divided into several stages between 30° and 65°. The former was observed in the fresh muscle, and the latter in the non-fresh muscle. We presume, thereefore. that the protein of the fish muscle plasm, which is originally single, may change into several kinds of protein with different coagulating temperatures. The curve above 65° may be resnlted by the serum albumin originated from the blood.

さきに清水[1]は魚肉蛋白の熱凝固曲線を研究し，それが2階段に分れるところから，魚肉中に凝固溫度を異にする2種類の蛋白の存在を推定したが，その解説に誤りを見出した。それを訂正する傍ら，その後実驗を繰り返して更に新しい事実を発見したので併せて報告する。

實驗 I.　前報と同様に精肉を採取・擂潰し，中性塩溶液を加えて 1～2 時間，氷で冷しながら抽出し，遠心分離して上澄液を試験に供した。その抽出用溶液・抽出液の pH 及び窒素含量は表の通りである。供試液 20 cc（ソダカツオウの場合は 30 cc）を 50cc容三角瓶に入れ，寒暖計及び空氣拔穴を附したゴム栓を施し，種々の溫度の水浴中に振盪しながら5分間浸漬した後直ちに冷却し，東洋濾紙 No. 3 で濾過し，濾液 10 cc 中の窒素を測定し，原液 10 cc 中の窒素量から減じて凝固蛋白窒素を算出した（但しサバの場合は 5 cc 中の窒素で表わした）。大抵の場合，水浴に浸漬後約3分間で恒溫に達した。

Kind of animal	Solution used for extraction	Nitrogen in 10 cc of extractive	pH of extractive
		mg	
Scomber japonicus (Houttyn)	1 M $MgSO_4$	41.6	5.4
Trachrus japonicus (T et S)	2 M NaCl	22.3	5.6
Auxis tapeinosoma I. (Bleeker)	1/2 M NaCl	24.2	5,8
〃 II.	1/4 M NaCl	22.4	5.6
Rabbit	1/2 M NaCl	17.4	5.7

昭和25年9月28日受理

実験結果を纒めると Fig. 1 の如くになる。これで見ると，凝固曲線に2つの型が分けられる。第1型はソウダカツオII・サバ・家兎等のように60～65° 附近までは曲線が滑かで，60～65° 附近から階段の現わるもの，第2型はアジ及びソウダガツオIに見るように 60° 以上に現われる階段の他に 60° までに数階段の存在するものである。同一蛋白が同一凝固温度を有つものとすれば，第1型は2種の蛋白の，第2型は数種の蛋白の存在を推定しなければならぬ。

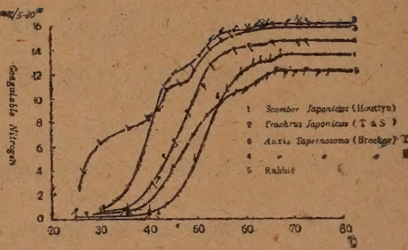


Fig. 1. Showing the heat coagulating curves of the muscle protein of various kinds of fish and rabbit.

實驗Iの考察　第1型は清水の前報(1) と全く同じ型で，只前報では曲線の階段が FUERTH の所謂 myosin 及び myogen の存在によるものと誤認した。FUERTH(2)によればは myosin は 47～50°(完全凝固は 50～53°)で，myogen は 55～65° で凝固するという。故に第1型に於ける始めの曲線（60° 附近で凝固完了）は myogen の凝固曲線に相当し，myosin に相当する凝固曲線は現われていない。65～70° 附近から第2の新しい曲線が現われるが，FUERTH によれば myogen は 65° でも尚少量の蛋白が凝固を免れ，65～70° で始めて完沈するというから或はそれかも知れない。しかし曲線が 70° 附近で忽然として階段的に出現する場合が多いことから見ると，その成因の主體は，凝固溫度を全然異による異種の蛋白の存在によるものと思われる。それは恐らく FUERTH も指摘したように血液 albumin（凝固溫度 70～73°）であろう。

第1曲線の終点は常に 60～63° 附近であり，前報コイの場合の1例だけが 70° 附近になつておるが，60° 附近に階段があることを見落しておるようでもあり，或は myogen の殘りかも知れない。またコイの他の例では 70° 附近に階段の認められない場合があつたが，それは出血操作を行つたのであるから，血抜が完全であつたと見れば容易に説明される。兎に角第1型では 60° 附近までに階段が現われないのであるから，これ以下の溫度に於て凝固を完了する蛋白（myosin 及び可溶性 myogen-fibrin）が存在しないと考えなければならぬ。

然るに第2型に於ては 60° までに，第1型には見られない階段があり，アジでは 50° 附近に，ソウダカツオでは 50° 及び 40° 附近に終点をもつ別の曲線が現わておる。 50° は FUERTH が指示せる myosin の，40° は可溶性 myogen-fibrin の，凝固溫度に一致する。

それならなぜこのような異る2つの型が現われるのであろうか。恐らく魚肉の新鮮度の差に基くのであろう。実験に使用した魚類は出來るだけ新しいものを選んだのではあるが，漁獲後いくばくかの時間を経過しており，その間に蛋白が変化しないとは保証出來ない。それ故に，ある場合には自然のままの蛋白が抽出され，他の場合には蛋白が変化したと考えられる。前報のカムルチー及びコイは何れも活魚であつて，60° までに階段が現われていない。

實驗 II　上の推定を確めるために次の実驗を行つた。コイ活魚を折半し，1片は直ちに採肉して 0～1° に冷却しながら M/5 NaCl で蛋白を抽出し，他の1片は冷蔵庫（5～8°）に8日間貯藏した後同様に処理した。活魚肉の場合は 180g に食塩溶液を加えて 1l とし，その濾液の pH 5.4，全窒素 19.5 mg / 10 cc で，冷藏魚肉の場合は 120 g を 1l とし，その pH 5.8，全窒素 13.8 mg / 10 cc であつた。

供試液 25 cc を所定温度に5分間保ち，凝固窒素を測定した。その結果は Fig. 2 の通りである。圖に見るように活魚肉の場合には曲線は平滑で，60° 附近までには階段が見られない。之に反して冷藏魚

肉に於ては明かに階段に分れており，そうしてその第1階段の終点は所謂 myosin の凝固点（50°）に相当する。

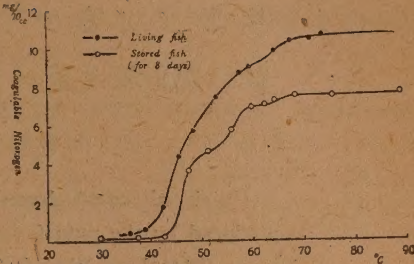


Fig. 2. Showing the heat coagulating curves of the muscle protein of the living fish and the refrigerated fish.

實驗IIの考察　魚肉蛋白の凝固曲線が魚肉の新鮮度によつて變化し，活魚肉に於ては 60° 附近まで平滑であるのに，冷蔵魚肉の場合曲線に階段が生ずるということは，本來1種類であつた蛋白が，鮮度が落ちたために，凝固溫度の異る異種の蛋白に変化したとしか考えられない。HALLIBURTON(3) や FUERTH は動物筋肉中に myosin 及び myogen（FUERTH の命名に從う）なる凝固性蛋白の存在を報告し，FUERTH は更に myogen から派生し，これより遙かに凝固点の低い可溶性myogen-fiblin を追加したが，本実驗結果からすれば，myosin さえも myogen から派生したのではないかと考えられる。

氏等は活動物肉を使用しておるけれども，蛋白の調製にあたつて透析・塩析・熱凝固分離等の操作を経ておるから，その間に自ら蛋白が変化し，そうして変化した蛋白の性質が調べられたと解せられる。

要するに，魚類や家兎の筋漿中には 60° 附近で凝固を完了する只1種類の凝固性蛋白が存在し，それが自然に或は種々の操作中に変化して，凝固点の異なる数種の蛋白に分れるのではなかろうか。

（本研究は文部省科学研究費による業績の1部である。）

文　献

（1） 清水　亘：日本水產学会誌，12（3），103，1943.
（2） FUERTH, Otto •on： Arch. f. exper. Pharm. u. Path., 36, 231, 1895.
（3） HALLIBURTON, W. D： J. Physiol., 8, 133, 1887,

腐敗によるマイワシの肉質變化並に腐敗毒生成に關する研究（第1報）

和田正太・富士川　滲

On the chemical changes and the toxic properties produced by the putrefaction of sardine fish. (Part I)

Masahuto WADA & Kiyoshi FUJIKAWA

In certain fishes available for mass production, such as the sardines, some remarkable changes are inevitable in the freshness of meat before the process of manufacturing into pressed cakes. With the view of examining the extent of actual influence of the changes in the freshness of meat upon the nutritive value of the pressed cakes of sardines, the authors, being aware of the importance of such an information in using the sarding cakes as efficacious foodstuff for raising various animals, made an experiment concerning the relationship between the changes of the freshness of fish-meat and those in the composition of amino-acids in the final product.

Results of these experiments are tabulated in more or less summarized forms in Table I-III.

はしがき

鰮の如き大量生産のものになると搾粕に処理せられる前，原料として既に鮮度に著しい異同の現われるのは必然的に免れ難いところであつて，此の原料の鮮度が搾粕に製造せられた後において栄養價値に如何なる影響を及ぼすものかを知つておくことは，之を動物飼料として用うるに当り相應に大切な事柄であると考える。

從來斯かる見地において研究を施行したものは必ずしも皆無ではなかつた。例えば，INGVALDSEN (1) 氏は鮮度の異なる原料にて製した魚粉のアミノ酸構成の異同を検した結果，不鮮な原料を使用したものは新鮮な原料を使用したものに比してチロシン，シスチン，トリプトファン等の割合が尠く，コラーゲン，エラスチンの如き結締組織の蛋白質の割合が多い事実を認め，又細菌による毒物の生成に関し，山田氏 (2) は鮮肉を好氣的に腐敗せしむれば分解緩徐に，且つ分解生成物は毒性尠きも，嫌氣的に腐敗せしむるときは猛毒を呈し，之を主としてヒスタミンの生成によることを認め，河合氏 (3) も亦腐敗毒中の猛烈なものはヒスタミン様物質であることを確認している。然しこれらの研究は皆部分的のもので，原料が不鮮に傾いた場合の魚粕製品の飼料としての適否を判断する資料として頗る不充分であるばかりでなく，試験資料が或るものは魚肉であり，或るものは肉類を用いたりしているのでマイワシを原料とした魚粕に対しては單なる考察の一資料を與えているに過ぎない。

今回の研究は卽ち是等知見の缺如を補う意味においてなされたもので，原料の鮮度と歩留，肉蛋白窒素の分布，不鮮原料を以て製造したる魚粕の毒性等諸多の事項に就いて検索を行い，以て魚粕製造上原料の鮮度に関して必要なる綜合知見に貢献せんとしたものである。

鮮度と肉質部のアミノ酸組成

先ず鰮の肉質部のみを氣溫に放置する場合，鮮度が如何に変化し凝固性蛋白質が如何なる程度の減少

昭和26年1月8日受理

をなし，且つまた此の凝固蛋白質の全窒素及びアミノ酸組成が如何なる変化を受くるものかを見た。

1. 実 驗 方 法

(イ) 原料の処理及び腐敗經過の觀察

新鮮なマイワシ 20 Kg. をよく淡水にて洗い，内臓，胸肉，皮部及び骨部を除去し，肉質部のみを肉挽器で細挫し，よく混和した後（肉量 10.6 Kg, 原料の 53 % に相当す）此の一部（1.1 Kg.）をとつて(ロ)項の処理を行い対照に充て，殘餘の肉は 950g. 宛を 1 L のビーカー 10 個に分取し，紙蓋を施して室温に夫々所定の日数を經過せしめ，此の間における肉質の外観を記録に留むると共に，所定の日数（毎 3 日）に就いては夫々（ロ）項の処置を施すこととした。

(ロ) 凝固蛋白質の調製及び全窒素の定量

上記（イ）項挫細肉の一定時を經過したものはビーカー 2 個宛，即ち 1.9 Kg. を取り，之を醋酸微酸性とした多量の水で煮沸し，必要あれば食塩少量を添加して沈澱を助け晒木綿で濾過し，濾液は極力回收し，凝固蛋白はアルコール及びエーテルで夫々 3 回宛処理し紙上に乾燥し粉碎して 0.5 mm. の篩を通過させ，その一部について全窒素の定量を行つた。

(ハ) 窒素の分布並にシスチン及びトリプトファンの定量

窒素の分布は Plimmer & Rosedale 兩氏 (4) の記載する Van Slyke 氏の方法に依つた。但しこの內シスチン N は別に定量することなく，全部リジン N 中に包含せしめた。シスチンは別途に直接定量して居るし且つ又その含有量も餘り多くないから，之をリジン中に含括せしめても左程の誤差は現われて來まいと考える。

シスチン及びトリプトファンの定量は凝固蛋白質そのものと，凝固蛋白に Wedemeyer 氏の消化処理を施したものとの二途について施行した。定量法としてはシスチンは奥田氏 (5) の沃素法，又トリプトファンは松山・森兩氏 (6) の改良した Mai & Rose 法に從つた。

猶お上記の Wedemeyer 氏法のペプシン消化液は極めて微量の沈澱を殘す程度に液化せしめたものであつた。

2. 經 過 と 成 績

先ず腐敗進行に伴ふ外觀の変化を表に現わして見ると大體第 1 表のようなものとなる。

第 1 表

Table I. Appearance of sardine meat under aerobic putrefaction.

Date sampled	Sample No.	Days elapsed	Room temp.	Outward appearance
Oct. 16th	0	0	22°C	fresh
19	1	3	21	coloured with yellowish brown at upper quarter part; oil browned darkly and solidified; putrid odour; somewhat softened.
22	2	6	22	oil oxidized to gummy state at the surface; putrid odour stronger than No. 1.
25	3	9	21	yellowed at upper half layer and outside of the bottom; stink more and more.
28	4	12	20	yellow at upper half layer; changed to pink at lower part; stink more intensely.
31	5	15	20	stink stronger than No. 4; dark brown gummy matter at the surface; yellow at upper layer and pink atliower part; meat softned, but not muddy

これによると肉は室温に貯蔵すること2日にして既に明瞭な腐臭を感じ，9日を経過するときは臭氣著しく，12日以後に至れば肉色も桃色となり腐敗肉特有の色調を呈するに至ることが判る。肉中の脂肪も亦変質し易く，極く短い時日に於いて既に変色と固化とが現われている。マイワシの油は不飽和度が高いからこの傾向が特に著しく出て來るのではないかと思う。この油の変質は凝固蛋白調製の際に著しい妨げをなした。

次に放置時間の長短による凝固蛋白質の收量及びその全窒素は第2表の通りである。

第　2　表

Table II. Yield of coagulated protein and its nitrogen content under aerobic putrefaction of sardine meat.

Sample No.	Days elapsed	Original wt. of meat	Coagulated protein		
			Yield of protein	Yield for meat wt.	Nitrogen content in anhydrous matter
No. 0	0	1.1 Kg	188.0 g.	17.09%	16.24 %
1	3	1.9	265.0	13.95	16.02
2	6	1.9	325.5	16.61	15.97
3	9	1.9	306.0	16.11	16.26
4	12	1.9	294.0	15.47	16.02
5	15	1.9	307.0	16.16	16.04

これによれば蛋白質の收量及び全窒素量は腐敗の進行に拘らず餘り変つていない。即ち肉部のみとなして放置したものは，臭氣や色調においては明らかな腐敗の進行を示すけれども，数字的にみて蛋白質自身の分解は餘り進行していないようである。この事実は從來の研究者によつても屢々確認ぜられたところであつた。BRAINBRIDGE(7), RETTGER & BERMAN (8) 氏等は，天然蛋白質は細菌によつて直接作用せられること尠きを認め，プロテオーズ及び高級ポリペプタイドの如きでも微生物に対しては稍々強い抵抗力を有するものとなし，ROBINSON & RETTGER (9) 氏等は又他の一面から細菌の正常繁殖には，蛋白質は必ずしも必須な要素でないことを認めている。尙お古く NENCKI(10), BAUMANN (11), BRIEGER(12), SALKOWSKI(13) 氏等は筋肉，臟器等を 37°C 又は盛夏の溫度に放置するも之を融解せしむる爲めには数ケ月の長き日子を要すると称し，又階堂(14) 氏は魚肉の內臓を除去し淡水でよく洗滌したものは腐敗は極めて遲いものであることの事実を報じている。這次の実験においては色調及び臭氣から視われる腐敗は相應に早く現われるけれども，数字的には可なり遲いものであることを示して居るので，以上諸家の観察と大體において一致しているが，此の間多少の新事実を加え得たものと見てよいと思う。

次に窒素の分布及びシスチン及びトリプトファンの含有量を示せば第3表の通りである。

第 3 表 a

Table III. a. Distribution of nitrogen

Sample	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
Days elapsed	0	3	6	9	12	15
Total N	100	100	100	100	100	100
Amide N	6.919	6.446	6.228	6.347	6.242	6.042
Humin N	3.063	3.574	2.503	2,592	2,579	2.532
Diamino acid N	30.032	29.498	30.914	30.705	30.386	28.854
Monoamino acid N	57.698	58.148	58.643	57.668	59.053	58.130
Arginine N	10.691	10.535	10.492	10.604	10,205	8.563
Histidine N	10.390	10.711	9.564	9.791	9.709	9.517
Lysine N	8.951	8.252	10.858	10.301	10.472	9.774

第 3 表 b

Table III. b. Cystine and Tryptophane

Sample	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
(i) Decomposition by acid						
Cystine	0.679 %	0.618 %	0.557 %	0.647 %	0,630 %	0.645 %
Tryptophane	1.748	1.690	1.778	1.622	1.557	1.712
(ii) Digestion by pepsin						
Cystine	0.817 %	0.807 %	0.816 %	0 860 %	0.805	0.878 %
Tryptophane	1.799	1.787	1.847	1.774	1.840	1.905

窒素の分布は，9日経過のものまでは餘り變化がなく，ただ 12 日以上経過のものがアルギニンNを20%減じて居るのが稍々目だつて居るばかりである。

又シスチン及びトリプトファン についても時日の経過による變化として認むべきものがない。即ち蛋白質の組成も此の程度の腐敗では餘り變化をして居ないことが窺われる。

要するに本実験の結果からみて，鱈の肉部のみを常溫に放置したのでは少くとも12日間では臭及び色調に著しい變化を呈しても，蛋白質の実質には餘り大きな變化のなかつたことが知られると思う。

文　　献

(1) Ingvaldsen: Can. Chem. & Met., **13** (1929), 129–131.
(2) 山田：国民衞生，第2卷10号，12号（大14）；第3卷2号（大15）.
(3) 河合：京都医学雑誌，27号（昭5）.
(4) Plimmer & Rosedale: Biochem. J., **19** (1925), 1004.
(5) Okuda: J. Dept. Agr., Kyusyu Imp. Univ., **1** (1925), 163.
(6) 松山・森：日化, 44 (1923).
(7) Brainbridge: J. Hyg., **11** (1911), 341.
(8) Rettger & Berman: J. Bact., **3** (1918), 387.
(9) Robinson & Rettger: ibid., **3** (1918).
(10) Nencki.: Chem. Ber., **9** (1g76), 232.
(11) Baumann: Z. f. physiol. Chem., **1** (1877), 60.
(12) Brieger: ibid., **4** (1880), 414.
(13) Salkowski: ibid., **8** (1884), 417.
(14) 階堂；国民衞生，第8卷2号，3号（昭6）.

腐敗によるマイワシの肉質變化
並に腐敗毒生成に關する研究（第2報）

和田正太・富士川 澪

On the chemical changes and the toxic properties produced by the putrefaction of sardine fish. (Part II)

Masahuto WADA & Kiyoshi FUJIKAWA

In the first report of this series of study we observed some chemical changes of meat during the putrefaction of sardine fish. Present paper deals with some results of experiments concerning the increase in toxic properties of sardine meat in the course of its postmortem putrefaction, which affords certain concrete informations on admittable extent of spoilage of meat for manufacture of sardine fish meal.

Principal data of experiments are represented in Table I—III.

腐敗毒生成に關する試驗

本報の試驗は，腐敗の進行につれ魚肉の生成する腐敗毒が動物體に対し如何なる生理的反應を呈するものなるかを知る目的で施行したもので，最初全魚體及び肉質部のみの二者を好氣的及び嫌氣的に腐敗せしめ，その呈する毒作用の概念を摑み，次に腐敗進行と毒作用亢進の関係を稍々精密に辿り，最後に不鮮原料より魚粉を製造してその毒性を觀察した。

I．全魚體並に肉質部のみを好氣的及び嫌氣的に腐敗せしめた場合の毒作用。

（1） 試料の処理　マイワシ凍魚を用い，全魚體試料は還元後ビーカーに採り好氣的に腐敗せしむるもの（935g.）は單に紙片で蔽い，嫌氣的に腐敗せしむる分（914g.）は試料上面を流動パラフインで被覆し紙片でビーカーを蔽い，約 25°C. の室温に 7 日間経過せしめ，肉質部試料は還元後頭部，內臓，皮部を除き，磨砕肉 588g 宛をビーカーに採り全魚體腐敗のものに準じて処理し，內臓包含の前者よりも腐敗遲延すべきを豫想して 10 日間を経過せしめた。

（2） 毒液の調製及び動物実驗　上記所定日数過後の資料を，醋酸微酸性となした水約 1 L と共に 20分間煮沸，歷搾，濾過，濃縮して透明液を得，之を煮沸滅菌，炭酸曹達にて中和後 100 cc. となし，その 10 cc. を家兎に皮下注射した。

（3） 腐敗の經過と注射試驗の結果　全魚體好氣的腐敗試料は 1 週間に於て腹部の崩壞を來し悪臭甚だしく，又その嫌氣的腐敗のものは腐敗の程度一層甚だしく下層魚は原形を止めないまでに崩れていた。肉質部腐敗試料は之に反して 10 日間経過後に於ても尚お嫌氣，好氣性の兩者共肉質軟化と桃色の腐色を示す程度で，たゞ脂肪が酸化して褐変固化せるを認めたに過ぎない。

之等腐敗試料より毒液を調整し家兎に皮下注射した結果は第一表の通りである。

昭和26年1月8日受理

第 1 表

Table I. Toxic strength of putrefied sardine meat tested upon the rabbit.

Putrefactive condition			Original wt. of sample	Aq. extract		Bd. wt. of rabbit	Results
days	temp.	mode		total	injected		
a) Fish body as a whole							
7	25°C.	aerobic	935 g	100cc.	10cc.	3.0Kg.	Died* after 3 days
7	25	anaerobic	941	100	10	3.0	Survived
b) Fleshy portion only							
10	25	aerobic	588	100	10	2.5	Died after 7.15 hr.
10	25	anaerobic	588	100	10	2.3	Died after 45 min.

* Test animal bit off the abdomen skin and viscera was exposed.

表に見る如く全魚體腐敗液注射試獸は生命を保持し居るのに対し，肉質部腐敗液によつては短時間で死亡してゐる。即ち外観上腐敗程度の遥かに進んでゐた全魚體試料の毒作用は逆に少い結果を示してゐる。この原因は恐らく腐敗日数の長短に由來し，全魚體腐敗に於る毒物の生成はその外觀に現われた分解程度を必ずしも反映することなく，肉質分解とは別にたゞ経過日数に從つて漸次に增加して行くものと見ることが出來る。又上表によれば毒物の生成は嫌氣，好氣性何れの場合も大差なく，全魚體では嫌氣性のものに却つて少ない位で，これらの相違は恐らく実驗誤差の範圍内に置かるべきものと思はれ，この点前記山田氏(1) 等のそれと少しく異つた形に出てゐる。

猶ほ毒液中毒症状を見れば，全魚體腐敗液の注射後試獸は蹲踞し，排泄作用あり，一時的に心悸亢進，呼吸頻数を來し，時日の経過につれ注射部位腐蝕固化した。好氣性腐敗液注射家兎が3日以後に死んだのは注射部の痒感により自ら皮膚を喰ひ破り内臓を露出させた結果である。肉質部腐敗液の中毒症狀は極めて烈しく，試獸は注射直後先づ蹲踞し，間もなく心悸亢進，呼吸頻数となり，その間下痢，排尿あり，次に吸氣性深呼吸に移り，間歇性痙攣あり，最後に強直痙攣と共に死への轉機をとつた。

II. 腐敗日数と毒物生成の増加

鮮マイワシを数群（4尾宛）に分ち，28°～30°C. に於て好氣性並に嫌氣性（アルカリ性ピロガロール使用）に腐敗せしめ，毎日その一群を醋酸々性の熱水と共に 30 分間煮沸，濾過，濃縮して得たるエキスを煮沸滅菌後炭酸曹達にて中和し，モルモットに皮下注射して毒性を檢し第二表 a, b の成績を得た。エキスは何れも黄褐色透明なるもスルホサリチル酸により溷濁を生ずる。

(1) 鮮マイワシを好氣性に腐敗せしめた場合（第2表 a)。

試獸は注射後著しく亢奮し嘔吐しつゝ跳廻り，次いで蹲踞し，呼吸頻数となり，暫時にして側位に顚倒し，特有の吸氣性深呼吸をなして呼吸困難に陥り，ついで呼吸は緩除となつた。或るものは間歇性痙攣を伴い，又多くは前回同樣排尿脱糞した。而して無力狀態にて橫臥した儘次第に昏睡狀態に陥り四肢痲痺して斃死した。死亡後は腹部の膨満を來せるもの多く，又試獸 M_2, M_3, M_4 は剖檢せるに肺に於て瀰浸性点狀出血あるを見た。ヒスタミン中毒の特有症狀である。

以上よりみれば鰮は好氣性腐敗2日にして烈しき毒性を呈し，順次日数の経過に從つてその毒性を增加する如き傾向を示し，又一旦生成せる毒物は容易に分解せられず，9日後に至り初めて分解せるに非ずやと思はしめるものあるが決定的ではない。要するに2日以上腐敗せしめたものは，モルモット體重 100g. 当り鮮魚約 0.9g. 相当量のエキスにて試獸を斃すことだけは分明したように思う。

第 2 表 a

Table II. (a) Relation between the advance of aerobic putrefaction of sardine whole body and the increase of toxic strength of their aqueous extract.

Putrefactive days	Putrefactive temp.	Wt. of sample fish	Bd. wt. of guinea pig (Mark)	Dose of injection: injected volume	Dose of injection: eqvl. wt. of fresh fish	Eqvl. fish wt. per 100 g. of animal	Results
0	18°C	230 g	464g (M_0)	2cc.	4.6 g.	0.99 g.	survived
1	21	205	448 (M_1)	2	4.1	0.92	〃
2	20	222	398 (M_2)	2	4.4	1.11	died after 12 hrs.
3	25	225	512 (M_3)	2	4.5	0.90	〃 1 hr.
4	25	227	509 (M_4)	2	4,5	0.88	〃 20min.
5	25	224	539 (M_5)	2	4.5	0.83	〃 19min.
6	25	215	524 (M_6)	2	4.3	0.82	〃 15min.
7	25	220	449 (M_7)	2	4.4	0.98	〃 19min.
8	25	220	530 (M_8)	2	4.4	0.83	〃 13min.
9	25	215	497 (M_9)	2	4.4	0.89	asphyxia 23min. later; died after 55min.

（2） 鮮マイワシを嫌氣的に腐敗せしめた場合。

第 2 表 b

Table II. (b) Relation between the advance of anaerobic putrefaction of sardine whole body and the increase of toxic strength of their aqueous extract.

Putrefacive days	Putrefacive temp.	Wt. of sampl fish	Bd. wt. of guinea pig (Mark)	Dose of injection: injected volume	Dose of injection: eqvl. wt. of fresh fish	Eqvl. fish wt. per 100 g. of animal	Results
0	22° C.	269 g.	375 g. (P_0)	2cc.	0.54 g.	0.14g.	survived
1	30	239	399 (P_1)	2	0.48	0.12	〃
2	30	245	421 (P_2)	2	0.49	0.12	〃
3	30	248	430 (P_3)	2	0.50	0.12	〃
4	30	251	413 (P_4)	2	0.50	0.12	〃
5	30	243	380 (P_5)	2	0.49	0.13	〃

試獸 P_0, P_1 は何等異狀を呈せざりしも他は蹲踞，嘔吐，脫糞，排尿，呼吸頻數をみ，P_2, P_3 は1時間後，P_4 は 2 時間後正常狀態に戻り，P_5 は間歇性痙攣を伴い最も苦悶の狀著しかつた。嫌氣性腐敗液の注射量は好氣性のそれの約 10 分の1に當り，期かる量に於ては毒性微弱なるを認めた。

III. 原料の鮮度を異にする魚粉の腐敗毒

（1） 試 料 の 処 理　マイワシ 20 尾宛の5群を約 25°C. の室溫に好氣性に腐敗せしめ，每日その一群を 20 分間煮沸，壓搾，熱風乾燥，粉碎して魚粉を製造した。経過日数による魚粉の收量及び室

素含有量の変化は第三表 a の通り腐敗の進行につれ収量の減少頗る著しく窒素含量も亦著減を示し，第一報肉質部のみの腐敗成績とは非常な相異で，肉蛋白分解は内臓包含のものに特に著しい。

第 3 表 a

Table III. (a) Relation between the degree of putrefaction of the sardine fish and the yield of manufactured fish meal together with the change in nitrogen content.

Sample No.	Putrefactive days	Putrefactive temp.	Fresh sample	Yield of meal	Yield rate	Moisture of meal	Nitrogen content in anhydrous matter
No. 1	1	25°C.	1,105 g.	173 g.	15.66%	10.84%	11.84 %
〃 2	2	25	1,012	144	14.22	10.75	11.74
〃 3	3	25	1,009	127	12.59	8.82	9.70
〃 4	4	25	1,099	134	12.19	8.79	9.49
〃 5	5	25	1,075	120	11.16	7.88	8.39

（2） 注射試験による結果　各魚粉に 3〜5 倍量の水を加え 70°C., 1時間熱浸出をなし，滅菌濾紙にて濾過後のエキスをその儘，若しくは濃縮後殺菌してモルモットに皮下注射した結果は第三表 b に示す通りである。この場合の試獣の一般中毒症状は前項で述べた所と同様であつた。

第 3 表 b

Table III. (b) Toxic strength of the aqueous extract of meal manufactured from various putrefied sardine fish.

Sample No. of meal	Dose of injection: injected volume	Dose of injection: eqvl. wt. of fish meal	Bd. wt. of guinea pig	Eqvl. meal wt. per 100g of animal	Results
No. 1	8 cc	3.7 g.	265 g.	1.63 g.	survived ; temporalily pressed for breath
No. 2	9	3.3	291	1.13	survived ; recovered after 25 min.
〃 〃	7.4 *	8.0	267	2.99	survived ; hind legs paralyzed
〃 〃	13.9 *	15.0	336	4.45	died after 5 min.
No. 3	9	3.3	297	1.10	survived ; recovered after 40 min.
〃 〃	4.6 *	6.0	260	2.30	survived ; recovered after 5 hrs.
〃 〃	5.5 *	8.0	301	2.65	died 30 min. later ; bleeding from lungs
〃 〃	6.9 *	10.0	312	3.21	died 10 min. later ; abdomen swelled
No. 4	8	3.7	331	1.11	survived ; temporalily shocked
No. 5	10	3.0	334	0.90	survived ; convulsed, crouched

* : concentrated aqueous extract of the meal.

各種魚粉の毒性を通覧するに，原料腐敗２日の魚粉はモルモット體重 100 g. 當り 4.45 g. 腐敗３日のものは 2,65 g. の魚粉の抽出液注射により初めて試獸を斃し，又魚粉 1 g. の抽出液は腐敗５日のものに於ても猶ほ致死量に達しない。第二表 a によれば腐敗魚そのものからの抽出液致死量は略ぼ 1.0 g. 內外の鮮魚相當量を示す故，鮮魚の含有水分等を考慮し比較せば，魚粉中の殘留毒素量は腐敗原料中含有量の僅か 20 分の１內外に過ぎぬ。

一方魚粉の實際給與例を獨乙農事試驗場の成績 (2) に採れば，生後 10 週間の犢に１日約 90g. を與え，以後 200g. に增加して初體重 80 Kg. から 180 Kg.に成育せしめ，又１日 30 g. から 200 g.を給し 56 Kg.の犢を 120 Kg. まで成育せしめてゐる。卽ち前者は體重 1 Kg. 當り 1.1 g，後者は 0.5〜1.7 g.の給與量となり，上記腐敗５日の魚粉に於て未だモルモット致死量に達しなかつた體重 100 g. 當り 1.0 g. の注射量に比べ猶約 10 分の１に過ぎぬ。卽ち不鮮原料より製造せる魚粉でも飼料に供して著しい中毒作用を呈することはないと見てよい。殊に本試驗結果は皮下注射によるものであり，飼料として經口給與をなす場合は毒性は一層緩和されるものと考えられる。然し斯かる魚粉の連續的給與が生理的に全然無害であるとは遽かに斷定し難い所で，腐敗による毒物生成が相應に著しいものである以上，飼料原料に矢張り新鮮なものを撰ぶのが安全とすべきである。

文　　獻

(1) 山田：國民衞生，第２卷第12号 (大14).

(2) Honcamp: Das Fischmehl als Futtermittel, II. Teil (1935).

昭和二十六年十一月二十日印刷
昭和二十六年十一月二十五日発行
第十七巻 第四號
本號定價 80 圓
(送料別)

編集兼発行者 須藤俊造
東京都中央区月島三号地東海区水産研究所内

発行所 日本水產學會
東京都中央区月島三号地東海区水産研究所内

振替口座 東京 59529 番

印刷者 金山金次郎
東京都中央区新川一ノ一

印刷所 金山印刷株式會社
東京都中央区新川一ノ一
電話京橋(56)1585

発賣所 大日本水産會
東京都中央区月島3号地
東海区水産研究所内